9 月 September
2020, 63(9): 1081 – 1090
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.09.005

绿原酸对美国白蛾幼虫生长发育和解毒相关蛋白活性的影响

潘忠玉, 莫夏娜, 孟 香, 陈 敏*

(北京林业大学林木有害生物防治北京市重点实验室, 北京 100083)

摘要:【目的】明确植物次生代谢物质绿原酸对美国白蛾 *Hyphantria cunea* 幼虫生长发育和解毒相关蛋白活性的影响。【方法】将含不同浓度绿原酸(0, 0.125%, 0.250%, 0.500%, 1.000%和2.000%)的人工饲料饲养美国白蛾幼虫,测定各组中5龄幼虫6 d内的死亡率, 各组中5龄幼虫在取食48 h时的营养效应指标,0.500%绿原酸处理组中幼虫(3龄幼虫开始)的生长发育,以及在取食36 h时各组中5龄幼虫肠道中的解毒相关蛋白活性。【结果】绿原酸处理组中美国白蛾5龄幼虫6 d内的死亡率随着人工饲料中绿原酸浓度的增大而逐渐升高,且显著高于对照组(取食含10% DMSO人工饲料的)。绿原酸对美国白蛾5龄幼虫的营养效应指标有显著影响,各处理组幼虫的相对取食量和近似消化率显著高于对照组,食物转化率显著低于对照组,除0.125%绿原酸处理组外,其余处理组幼虫的食物利用率和相对生长速率也显著低于对照组。0.500%绿原酸处理使美国白蛾3–5龄幼虫发育历期比对照组显著延长28.24%(3.7 d),老熟幼虫(6–7龄幼虫)的发育历期缩短8.97%(0.7 d),且幼虫总成活率、化蛹率、羽化率、雌雄性比及产卵量等各项指标均显著低于对照组。不同浓度绿原酸处理对美国白蛾幼虫肠道中的细胞色素P450酶(CYP450)、谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)和ABC转运蛋白(ABC transporters)的活性具有显著影响,但对羧酸酯酶(CarE)活性未见显著影响。【结论】绿原酸可影响美国白蛾幼虫的存活率、食物利用效率、生长发育和繁殖,而美国白蛾幼虫可能通过调节食物利用率和诱导其解毒相关蛋白活性从而对食物中绿原酸产生适应性。

关键词: 美国白蛾; 绿原酸; 营养效应; 生长发育; 解毒相关蛋白

中图分类号: Q968 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2020)09-1081-10

Effects of chlorogenic acid on the growth and development and detoxification-related protein activities in *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) larvae

PAN Zhong-Yu, MO Xia-Na, MENG Xiang, CHEN Min* (Key Laboratory of Beijing for Forest Pest Control, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract:【Aim】This study aims to unveil the effects of chlorogenic acid on the growth and development and detoxification-related protein activities in the larvae of the fall webworm, *Hyphantria cunea*.【Methods】*H. cunea* larvae were fed with the artificial diets containing different concentrations of chlorogenic acid (0, 0.125%, 0.250%, 0.500%, 1.000% and 2.000%), and the mortality rates of the 5th instar larvae in various groups within 6 d, the nutritional efficiency parameters of the 5th instar larvae in various groups at 48 h after feeding, the growth and development of the larvae (from the 3rd

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1200400)
作者简介: 潘忠玉, 女, 1995年2月生, 辽宁丹东人, 硕士研究生, 研究方向为林业害虫控制, E-mail: 1002173966@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: minch@bjfu.edu.cn
收稿日期 Received: 2020-01-11; 接受日期 Accepted: 2020-04-22

instar) in the 0.500% chlorogenic acid treated group, and the detoxification-related protein activities in the gut of the 5th instar larvae in various groups at 36 h after feeding were determined. 【Results】The mortality rates of the 5th instar larvae of *H. cunea* in the chlorogenic acid treated groups in 6 d increased with the increase of the concentration of chlorogenic acid in the artificial diets, and were significantly higher than that in the control group (fed on the diet with 10% DMSO). Chlorogenic acid had significant influences on the nutritional efficiency of the 5th instar larvae of *H. cunea*. The relative consumption rate (RCR) and approximate digestibility (AD) in the chlorogenic acid treated groups were significantly higher than those in the control group, while the efficiency of conversation of digested food (ECD) in the chlorogenic acid treated groups, and the efficiency of conversation of ingested food (ECI) and relative growth rate (RGR) in the chlorogenic acid treated groups except the 0.125% chlorogenic acid treated group were significantly lower than those in the control. The 0.500% chlorogenic acid extended the duration of the 3rd – 5th instar larvae by 28.24% (3.7 d) while shortened the duration of the mature larvae (6th – 7th instar) by 8.97% (0.7 d). Moreover, the developmental parameters such as the larval survival rate, pupation rate, eclosion rate, female-to-male sex ratio and oviposition amount in the 0.500% chlorogenic acid treated group were significantly lower than those in the control group. Various concentrations of chlorogenic acid had significant influences on the activities of CYP450, GSTs, UGT and ABC transporters in the gut of the 5th instar larvae of *H. cunea*, but showed no significant effects on the CarE activity. 【Conclusion】Chlorogenic acid can affect the survival rate, the food utilization efficiency and the growth and development of *H. cunea* larvae. *H. cunea* larvae may adapt chlorogenic acid in food by regulating food utilization efficiency and inducing the activities of metabolic detoxification-related proteins.

Key words: *Hyphantria cunea*; chlorogenic acid; nutritional effect; growth and development; detoxification-related protein

昆虫与植物在长期协同进化中形成了相对稳定的生态关系。植物为植食性昆虫提供营养物质的同时,也进化出一系列物理和化学防御机制来抵抗昆虫的取食。其中,植物次生代谢物在抵御昆虫的取食中发挥着重要作用(钦俊德和王琛柱, 2001; Rani and Jyothsna, 2010; Gong and Zhang, 2014)。植物次生代谢物质种类多样,而酚类是植物重要的次生代谢物质之一(徐正浩等, 2004)。不少研究证明,一些植物酚类次生代谢物质如绿原酸、单宁酸等会对昆虫的取食、生长、发育以及繁殖等活动产生不利影响,有的甚至具有直接毒杀作用(张时妙等, 2005; 王晓丽等, 2014)。

在长期的协同进化过程中,昆虫也形成了行为、生理生化等机制来应对植物次生代谢产物的胁迫,如不少昆虫在代谢过程中就能够以不同的解毒机制对抗寄主植物中的有毒物质(Felton and Tumlinson, 2008; 朱香镇等, 2018)。已有的研究表明,昆虫解毒相关蛋白主要有细胞色素 P450 酶(cytochrome P450 monooxygenase, CYP450)、羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)、ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporters)[简称 ABC 转运蛋白(ABC transporters)]等(Francis *et al*., 2005; Winde and Wittstock, 2011; Jin *et al*., 2018),这些解毒相关蛋白通过参与外源有毒物质的分解和代谢,从而使昆虫产生适应性(Zhang *et al*., 2012)。

美国白蛾 *Hyphantria cunea*,属鳞翅目(Lepidoptera)灯蛾科(Arctiidae),是我国重要的检疫性害虫。该虫原产北美洲(Gomi, 2007; Sullivan *et al*., 2011),自 1979 年在辽宁省丹东市首次被发现后,目前已经扩散至我国 13 个省(区、市)共计 598 个县级行政区(国家林业局 2020 年第 3 号公告)。美国白蛾寄主广泛,多达 630 余种(Sullivan and Ozman-Sullivan, 2012)。我们前期研究发现,不同寄主植物对美国白蛾有明显的影响,该虫对桑 *Morus alba*、金银木 *Lonicera maackii* 等不同寄主植物的取食量、选择率和营养效应不同,取食不同寄主植物的美国白蛾幼虫体内的 AchE, GSTs, CarE 和 CYP450 的活性也存在显著差异(李路莎等, 2018)。我们认为,寄主植物的次生代谢物可能在其中发挥

重要作用，然而，不同寄主植物所含次生代谢物质的种类组成及含量各异，逐一研究明确各种次生代谢物的影响往往存在较大困难。

绿原酸(chlorogenic acid, $C_{16}H_{18}O_9$, 分子量 354.31)属正双羟基酚类化合物，是植物中常见的一种次生代谢物，从高等双子叶植物到蕨类植物均有报道(高锦明等, 1999)。绿原酸在美国白蛾的喜食寄主桑中的含量较低(0.39% ~1.02%)(孙莲等, 2003; 郝静怡等, 2019)，在其非喜食的寄主植物金银木中含量则较高(3.366%)(朱成姣等, 2016)，在非寄主植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 中含量可高达 4.07%(张康健等, 1999)，这寓示绿原酸在影响美国白蛾对寄主植物的取食策略中可能发挥着重要作用。目前已有研究表明绿原酸对昆虫的生长发育产生不利影响，甚至可在昆虫体内可被氧化为毒性更高的醌类物质，对昆虫产生直接毒杀作用(胡增辉等, 2009; Kundu and Vadassery, 2019)。王晓丽(2014)发现舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫取食含有单宁酸、绿原酸的人工饲料后不能完成正常的生长发育，幼虫体重比对照低约 67.2% ~75.0%，幼虫历期延长 2~4 倍，蜕皮受阻，至 4 龄时全部死亡。谷实夜蛾 *Helicoverpa zea* 在摄取含绿原酸和咖啡酸人工饲料后，发育历期明显延长(Summers and Felton, 1994)。舞毒蛾幼虫取食含绿原酸人工饲料后羧酸酯酶 CarE 活性随着时间呈现递减趋势，但始终比取食正常人工饲料的酶活性强(刘海晶, 2016)。然而，有关绿原酸对美国白蛾生长发育和生理代谢的影响尚不得而知。有鉴于此，本研究通过在人工饲料中添加不同浓度的绿原酸饲养美国白蛾幼虫，比较和分析绿原酸对该虫营养效应、生长发育和解毒相关蛋白活性的影响，以期为深入探究美国白蛾的寄主适应机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试虫及饲养条件

研究中所用的美国白蛾试虫为实验室人工饲养种群。将美国白蛾初孵幼虫转入含有人工饲料的养虫杯中，置于昆虫培养箱内(温度 25±1℃，相对湿度 73%，光周期 16L:8D)饲养。美国白蛾人工饲料配制以及饲养条件采用曹利军等(2014)。

1.2　人工饲料及绿原酸浓度处理设置

根据文献报道中美国白蛾不同寄主植物中的绿原酸浓度，其喜食寄主植物桑中浓度为 0.39% ~1.02%，非喜食寄主金银木中浓度为 3.366%(孙莲等, 2003; 朱成姣等, 2016; 郝静怡等, 2019)，则研究中设置人工饲料中绿原酸的浓度梯度(m/m)分别为 0.125%，0.250%，0.500%，1.000% 和 2.000%。制作人工饲料期间，将所有主要材料在液态条件下混合(约 65℃)，将 0.4 g 绿原酸(上海源叶生物科技有限公司，纯度≥98%)用 5 mL 10% 二甲基亚砜(DMSO)于室温下溶解后，加入 15 g 人工饲料中配置成 2.000% 绿原酸人工饲料，相同方法配制其余浓度绿原酸饲料，以添加 5 mL 10% DMSO 的人工饲料为对照组。

1.3　不同浓度绿原酸处理美国白蛾幼虫的死亡率测定

根据美国白蛾特性，5 龄幼虫食量大，生长发育旺盛，且肠道易于解剖，适宜进行试验测定。选取生长发育一致的 5 龄健康幼虫，饥饿 12 h 后转入不同浓度(0.125%，0.250%，0.500%，1.000% 和 2.000%)的绿原酸人工饲料饲养。以 10% DMSO 人工饲料饲养的 5 龄健康幼虫为对照。每个养虫杯接虫 10 头幼虫为一个重复，每浓度处理设 4 个重复(即 4 个养虫杯)。饲养条件同 1.2 节。每天观察饲料是否新鲜，不新鲜的及时更换，并记录幼虫死亡情况，为避免老熟幼虫出现预化蛹状态影响试验结果，于处理 6 d 后终止观察并统计数据。以毛笔轻触美国白蛾幼虫虫体两次，无反应者视为死亡。死亡率(%)=(死亡幼虫个体数/供试幼虫总数)×100%。

1.4　不同浓度绿原酸处理美国白蛾的营养效应测定

选取生长发育一致的 5 龄健康幼虫，饥饿 12 h 后，转入不同浓度的绿原酸人工饲料(0.125%，0.250%，0.500%，1.000% 和 2.000%)饲养，以 10% DMSO 人工饲料饲养的 5 龄健康幼虫为对照。饲养条件同 1.2 节。每个培养杯接虫 5 头为一个重复，每浓度处理设 3 个重复。

幼虫取食前称取人工饲料重量，48 h 后取出剩余饲料，饥饿 12 h 后使幼虫排出粪便，称取取食后幼虫的鲜重。然后将幼虫、粪便、剩余饲料放入烘箱，80℃下烘干至恒重，分别称量其干重。此外，在相同环境下，另外采集取食前人工饲料和刚饥饿处理后的 5 龄幼虫，称取鲜重，进行烘干，记作取食前饲料干重和取食前幼虫干重。根据饲料含水量和幼虫含水量推算取食前幼虫以及投喂饲料干重。依照下列公式计算各营养指标(Waldbauer, 1968)：

近似消化率(AD)(%)=$(I-F)/I\times100\%$；

食物利用率(ECI)(%) = $G/I \times 100\%$;

食物转化率(ECD)(%) = $G/(I-F) \times 100\%$;

相对生长速率(RGR)(g/g·d) = $G/(B \times T)$;

相对取食量(RCR)(g/gd) = $I/(B \times T)$。

式中,G: 虫体增重(G = 取食后幼虫干重 - 取食前幼虫干重); B: 试验期间幼虫平均体重[B = (取食前幼虫干重 + 取食后幼虫干重)/2]; I: 取食量(I = 取食前饲料干重 - 取食后饲料干重); F: 粪便干重; T: 试验天数。

1.5 0.500%绿原酸处理美国白蛾幼虫的生长发育指标测定

参照王晓丽等(2014)的方法,以及预试验结果,美国白蛾低龄(1 和 2 龄)幼虫对绿原酸非常敏感,即使采用较低浓度的绿原酸(0.250%),试虫均很快死亡,无法完成各项生长发育指标的数据采集,所以将生长发育一致的 3 龄健康幼虫饥饿 12 h 后,转入含 0.500% 绿原酸的人工饲料饲养,同时设置含 10% DMSO 的人工饲料饲养的 3 龄幼虫作对照组。每 30 头幼虫(饲养于一个养虫杯)为一个重复,每处理设 3 个重复,处理前称量每个处理的幼虫平均体重,第一次蜕皮后,将幼虫转移到新的养虫杯内,一杯 1 虫,单头饲养。饲养条件同 1.2 节。每天观察并记录幼虫的发育情况,包括蜕皮、化蛹、死亡等。羽化后,将雌雄成虫转移到纱网笼内进行自由交配、产卵,对卵块进行计数。

1.6 不同浓度绿原酸处理美国白蛾的解毒相关蛋白活性测定

选取生长发育一致的 5 龄健康幼虫,饥饿 12 h 后,转入含 0.125%, 0.250%, 0.500%, 1.000% 和 2.000% 的绿原酸人工饲料饲养(饲养条件同 1.2 节),以含 10% DMSO 人工饲料饲养的 5 龄幼虫为对照。每个养虫杯接虫 5 头为一个重复,每个处理设 3 个重复。饲养 36 h 后,随机挑选试虫进行解剖,取出肠道,用预冷的磷酸缓冲液(pH 7.0),按中肠质量(g)∶磷酸缓冲液体积(mL) = 1∶9(m/v)的比例进行冰浴匀浆,4℃ 8 000 r/min 离心 10 min 后,取上清即为酶原液 4℃保存,用于分析食料中不同浓度的绿原酸对美国白蛾幼虫各解毒相关蛋白活性的影响。

用谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)测定试剂盒(YX-W-A204,上海优选生物科技有限公司)、羧酸酯酶(CarE)测定试剂盒(ml036265,上海酶联生物科技有限公司)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)测定试剂盒(ml062849)、ATP 结合盒转运蛋白(ABC 转运蛋白)测定试剂盒(ml341674)、细胞色素 P450 酶测定试剂盒(JL22832,上海将来实业有限公司)测定肠道酶源液 5 种解毒相关蛋白活性;用蛋白浓度测定试剂盒(PW0103, BIOMIGA, 美国)测定肠道酶源液蛋白浓度。各解毒相关蛋白活性和蛋白定量测定的具体方法均按照相应试剂盒说明书进行。

1.7 数据分析

运用 SPSS21.0 软件计算美国白蛾幼虫在绿原酸处理下的死亡率、营养效应指标、生长发育各项指标、解毒相关蛋白活性的平均值和标准误,采用独立样本 t 检验和单因素方差分析(one-way ANOVA)进行分析,以 Tukey 氏检测法比较不同处理间的差异显著性($P<0.05$),运用 Origin8.0 软件绘图。

2 结果

2.1 绿原酸对美国白蛾 5 龄幼虫死亡率的影响

用含不同浓度绿原酸的人工饲料饲喂美国白蛾 5 龄幼虫 6 d 后的死亡率结果见图 1。结果表明,含不同浓度绿原酸的人工饲料饲养美国白蛾 5 龄幼虫,3 d 后开始出现死亡个体,死亡高峰期出现在第 3 - 5 天之间; 6 d 后不同浓度绿原酸处理的美国白蛾幼虫死亡率有显著差异(F = 48.634, $P<0.05$),且绿原酸浓度越高,幼虫的死亡率越高,0.125% 绿原酸处理组死亡率为10.00% ±4.08%,而 2.000% 绿原酸处理组死亡率达到67.50% ±4.79%。

2.2 绿原酸对美国白蛾 5 龄幼虫营养效应的影响

不同浓度绿原酸处理 48 h 后的美国白蛾 5 龄幼虫的营养效应指标见表 1。结果显示,不同浓度绿原酸处理的美国白蛾 5 龄幼虫的相对取食量(RCR)和近似消化率(AD)显著高于对照组($P<0.05$),食物转化率(ECD)显著低于对照组($P<0.05$);除 0.125% 绿原酸处理组外,其余浓度处理组幼虫的食物利用率(ECI)和相对生长速率(RGR)也显著低于对照组($P<0.05$)。

2.3 绿原酸对美国白蛾幼虫生长发育的影响

用含 0.500% 绿原酸的人工饲料饲养美国白蛾幼虫(从 3 龄幼虫开始),各龄期发育历期情况如表 2。结果表明,与对照组相比,0.500% 绿原酸处理使 3 - 5 龄幼虫的发育历期显著延长 28.24% (3.7 d)($P<0.05$),但 6 和 7 龄幼虫的发育历期缩短 8.97% (0.7 d),整体延长 3 - 7 龄幼虫的发育历期约 3.0 d。

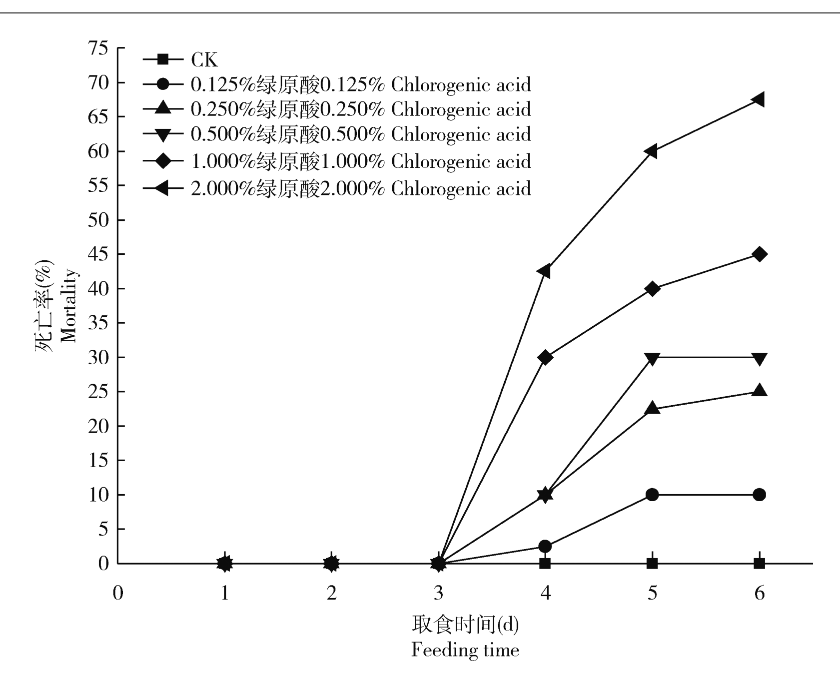


图 1　取食含不同浓度绿原酸的人工饲料后美国白蛾 5 龄幼虫的死亡率

Fig. 1　The mortality of the 5th instar larvae of *Hyphantria cunea* fed on the artificial diets containing different concentrations of chlorogenic acid

以添加 10% DMSO 人工饲料作对照(CK)。Artificial diet with 10% DMSO was used as the control (CK). 下同 The same below.

表 1　取食含不同浓度绿原酸的人工饲料 48 h 后美国白蛾 5 龄幼虫的营养效应指标

Table 1　Nutritional efficiency parameters of the 5th instar larvae of *Hyphantria cunea* fed on the artificial diets containing different concentrations of chlorogenic acid for 48 h

绿原酸浓度(%) Chlorogenic acid concentration	AD (%)	ECD (%)	ECI (%)	RGR (g/g·d)	RCR (g/g·d)
0.125	0.9775 ±0.0041 a	0.0135 ±0.0072 b	0.0131 ±0.0070 a	0.1918 ±0.0822 a	17.9151 ±3.2328 a
0.250	0.9721 ±0.0034 a	0.0079 ±0.0041 b	0.0076 ±0.0042 b	0.0844 ±0.0483 b	12.2045 ±1.0667 ab
0.500	0.9701 ±0.0024 a	0.0083 ±0.000 b	0.0081 ±0.0004 b	0.1087 ±0.0032 b	13.5116 ±0.4036 ab
1.000	0.9715 ±0.0050 a	0.0111 ±0.0021 b	0.0108 ±0.0019 b	0.1255 ±0.0133 b	11.9407 ±0.8634 b
2.000	0.9742 ±0.0000 a	0.0064 ±0.0022 b	0.0063 ±0.0020 b	0.0835 ±0.0248 b	13.5681 ±0.5161 ab
0 (CK)	0.8743 ±0.0072 b	0.1205 ±0.0061 a	0.1051 ±0.0051 a	0.2547 ±0.0261a	2.4079 ±0.1900 c

AD：近似消化率 Approximate digestibility；ECD：食物转化率 Efficiency of conversation of digested food；RCR：相对取食量 Relative consumption rate；ECI：食物利用率 Efficiency of conversation of ingested food；RGR：相对生长速率 Relative growth rate. 表中数据为平均值 ± 标准误，同一列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$，Tukey 氏检验)。Data in the table are mean ± *SE*, and different small letters following the data in a column show significant difference ($P<0.05$, Tukey's test).

表 2　0.500%绿原酸对美国白蛾幼虫发育历期的影响

Table 2　Effects of 0.500% chlorogenic acid on the developmental duration of *Hyphantria cunea* larvae

处理 Treatments	发育历期 Developmental duration (d)					幼虫发育历期(3 龄起) Larval duration from the 3rd instar (d)
	3 龄幼虫 3rd instar larva	4 龄幼虫 4th instar larva	5 龄幼虫 5th instar larva	6 龄幼虫 6th instar larva	7 龄幼虫 7th instar larva	
CK	3.0 ±0.02 b	5.4 ±0.09 b	4.7 ±0.06 b	3.8 ±0.08 a	4.0 ±0.11 a	20.9 ±0.14 b
绿原酸 Chlorogenic acid	4.0 ±0.00 a	7.5 ±0.11 a	5.3 ±0.07 a	3.6 ±0.06 a	3.5 ±0.07 b	23.9 ±0.05 a

表中数据为平均值 ± 标准误，同一列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$，t 检验)。Data in the table are mean ± *SE*, and different small letters following the data in a column show significant difference ($P<0.05$, t-test). 表 3 同 The same for Table 3.

0.500%绿原酸处理后美国白蛾的其他各项生长发育指标如表3所示。结果显示，绿原酸处理组的幼虫总存活率(66.67%)、化蛹率(90.00%)、成虫羽化率(81.49%)和雌雄性比(0.29)均明显低于对照组，且平均单雌产卵量(429.60±65.35粒)比对照(707.33±26.78粒)显著减少($P<0.05$)。由此可知，绿原酸对美国白蛾的生长发育和繁殖具有负面影响。

表3 0.500%绿原酸对美国白蛾5项生长发育指标的影响

Table 3 Effects of 0.500% chlorogenic acid on 5 developmental parameters of *Hyphantria cunea*

处理 Treatments	幼虫总存活率(%) Total survival rate of larvae	化蛹率(%) Pupation rate	羽化率(%) Eclosion rate	性比 Sex ratio (♀/♂)	单雌产卵量 Number of eggs laid per female
CK	80.00	100.00	91.68	0.61	707.33±26.78 a
绿原酸 Chlorogenic acid	66.67	90.00	81.49	0.29	429.60±65.35 b

2.4 绿原酸对美国白蛾5龄幼虫解毒相关蛋白活性的影响

用含5种不同浓度(0.125%, 0.250%, 0.500%, 1.000%和2.000%)绿原酸的人工饲料分别饲养美国白蛾5龄幼虫36 h后，肠道内5种解毒相关蛋白的活性如图2所示。结果表明，不同浓度的绿原酸对美国白蛾GSTs($F=97.577$, $P<0.001$)、UGT($F=6.421$, $P=0.004$)、CYP450($F=2.471$, $P<0.001$)和ABC转运蛋白($F=5.761$, $P=0.006$)的活性均有显著影响。由图2(A, D, E)可知，绿原酸对美国白蛾中肠的ABC转运蛋白，CYP450和GSTs活性均有不同程度的诱导作用且诱导趋势相似。随着绿原酸浓度的升高，ABC转运蛋白、CYP450和GSTs 3种解毒相关蛋白的活性也逐渐升高，然后略微降低。当绿原酸浓度低于0.250%时，CYP450酶活性与对照组无显著差异($P>0.05$)；绿原酸浓度为0.500%~2.000%时，CYP450酶的活性被显著诱导，在1.000%时活性达到最大(12.46 U/L)。在试验浓度范围内GSTs活性均被显著诱导，在绿原酸浓度为1.000%时GSTs活性达到最大(34.21 U/mg pro)。在试验浓度内ABC转运蛋白活性也被不同程度诱导且与对照组差异显著，当绿原酸浓度为0.500%时，对ABC转运蛋白的活性诱导能力达到最大。0.125%的绿原酸对美国白蛾UGT的活性具有显著诱导作用($P<0.05$)，而其余浓度处理的UGT活性与对照相比均无显著差异($P>0.05$)(图2: B)。而由图2(C)可知，各浓度绿原酸对美国白蛾幼虫CarE活性均未见显著影响($F=0.166$, $P=0.970$)。

3 讨论

本研究通过在美国白蛾人工饲料中添加不同浓度的绿原酸，调查了绿原酸对美国白蛾幼虫死亡率、营养效应指标和多项生长发育指标的影响，以及不同浓度绿原酸对美国白蛾5龄幼虫5种解毒相关蛋白活性的影响。绿原酸处理组美国白蛾幼虫3 d后才开始有个体死亡，死亡高峰期在第3－5天之间(图1)，说明绿原酸在本研究的试验浓度范围内对美国白蛾不具有急性杀虫作用，但随着取食时间延长，绿原酸可能在幼虫体内积累而发挥杀虫作用。王晓丽等(2014)用0.3%绿原酸处理舞毒蛾2龄幼虫也得到类似结果，处理20 d后幼虫死亡率从20%迅速上升到50%，到34 d时死亡率达到100%；其他酚类如50 μg/mL山奈酚处理72 h后致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 4龄幼虫死亡率达到82%(黄继光等, 2014)。

本研究结果表明，绿原酸处理对幼虫的营养效应指标具有显著影响，处理组5龄幼虫的相对取食量和近似消化率显著高于对照组，但是食物转化率、食物利用率和相对生长速率显著低于对照组(表1)。可能由于绿原酸的存在致使美国白蛾对营养物质的利用率降低，从而影响其生长发育。Barbenhenn等(2003)也提出，绿原酸在许多鳞翅目幼虫中肠的碱性、氧化的环境内，可对其生长发育产生不利影响，可能是由于绿原酸被昆虫的过氧化物酶氧化成氯醌后与氨基酸(组氨酸、半胱氨酸等)结合，降低氨基酸的生物利用度，从而抑制昆虫的生长(Kundu and Vadassery, 2019)。研究表明，酚酸物质与营养素或酶结合时，对虫体消化吸收有不利影响(Appel, 1993)。如谷实夜蛾在摄取定量香豆酸后，相对生长速率显著降低(Summers and Felton, 1994)。斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 取食1%没食子酸后，食物利用率显著降低(黄敏燕和李雪峰, 2018)。本研究中绿原酸处理使美国白蛾幼虫的相

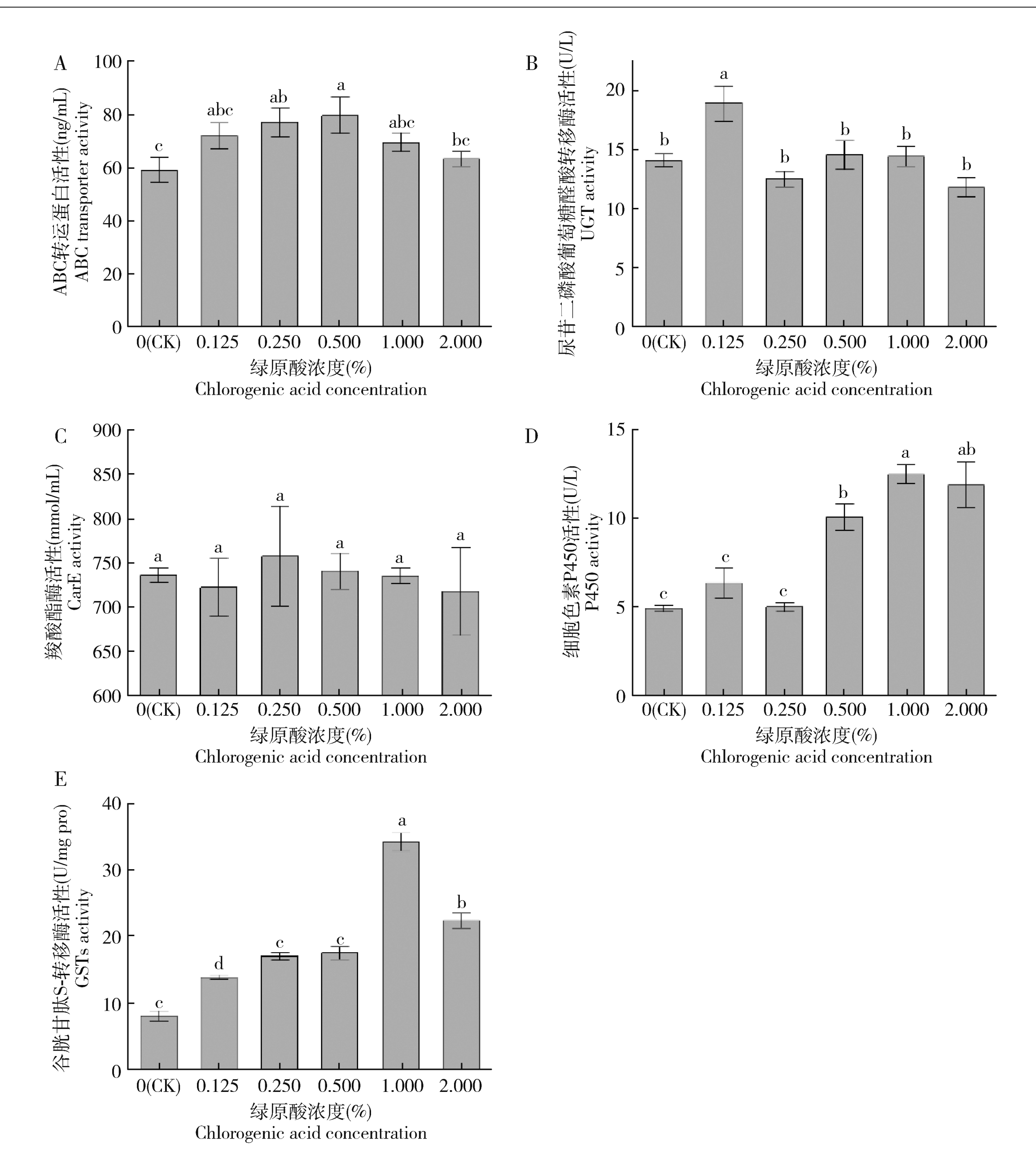


图 2　取食含不同浓度绿原酸的人工饲料 36 h 后美国白蛾 5 龄幼虫肠道中 5 种解毒相关蛋白的活性

Fig. 2　Activities of five detoxification-related proteins in the gut of the 5th instar larvae of *Hyphantria cunea* fed on the artificial diets containing different concentrations of chlorogenic acid for 36 h

A：ABC 转运蛋白 ABC transporters；B：尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 UDP-glucuronosyltransferase（UGT）；C：羧酸酯酶 CarE；D：细胞色素 P450 酶 CYP450；E：谷胱甘肽 S-转移酶 GSTs. 柱上不同小写字母代表不同浓度绿原酸处理的酶活性差异显著($P<0.05$，Tukey 氏检验)。Different small letters above bars show significant difference in enzyme activities among treatments with different concentrations of chlorogenic acid ($P<0.05$, Tukey's test).

对取食量和近似消化率上升(表 1)，表明美国白蛾可通过提高取食量和食物的消化率来补偿对食物营养利用率低的影响，满足其生长发育的营养需求，从而对食物中一定浓度绿原酸产生适应性反应。

本研究中用 0.500% 绿原酸处理的饲料喂食美国白蛾 3 龄幼虫，使该虫化蛹率、羽化率、雌雄性比以及单雌产卵量降低(表 3)，表明食物中的绿原酸可对美国白蛾的生长发育及繁殖造成负面影响。绿原酸导致美国白蛾幼虫(3－5 龄)龄期延长，可能是因为美国白蛾在抵御绿原酸的过程中产生了适合度代价，摄入的能量一部分用于生长发育，而另一部分则消耗用于绿原酸的解毒代谢，而老熟幼虫(6－7 龄)的发育历期缩短，可能与美国白蛾倾向于以蛹度过不良环境，绿原酸处理导致老熟幼虫提前化蛹

等有关(邓煜, 2018)。本研究绿原酸降低美国白蛾生长发育和繁殖力结果与 Osier 等(2000)研究舞毒蛾的产卵量与其食料的含酚酸量成反比的结论相一致,这为 Awmack 和 Leather(2002)提出的昆虫在长期进化的过程中可通过调节自身的繁殖能力来适应不同适合度的食物的推测提供了新的证据。

植物次生代谢产物可以诱导植食性昆虫解毒相关蛋白活性发生变化,从而可能提高这类昆虫的适应能力(Hlavica, 2011; 陈澄宇等, 2015)。本研究结果表明,绿原酸在供试浓度范围内能够诱导美国白蛾幼虫的细胞色素 P450 酶的活性(图 2)。已有研究证实 CYP450 酶能在昆虫消化道等组织内为有毒次生代谢物质引入羟基、羧基和氨基等化学基团,提高有毒次生代谢物质的水溶性和反应活性,降解为毒性更低的形式(Chung *et al*., 2006; Cui *et al*., 2016)。供试浓度范围内的绿原酸能够一定程度上诱导美国白蛾 GSTs 活性。GSTs 通过催化还原性谷胱甘肽(GSH)与有毒的疏水亲电物质发生轭和反应,使之毒性降低,可溶性增强而排出体外,从而达到解毒的目的(Firidin *et al*., 2008)。羧酸酯酶具有广泛的底物特异性,可以水解羧酸酯键、酰胺键和硫酯键,在对含酯键外源毒物的水解方面起重要作用,也可以作为结合蛋白与外源毒物不可逆结合,使其不能达到靶标,从而起到对外源毒物的隔离作用(Hemingway, 2000)。绿原酸对舞毒蛾幼虫体内羧酸酯酶 CarE 活性起诱导作用(刘海晶, 2016),但本研究结果表明绿原酸对美国白蛾 CarE 活性没有显著影响(图 2),表明不同昆虫对绿原酸的解毒响应机制不同,美国白蛾通过诱导其他解毒相关蛋白的活性来抵御绿原酸危害。本研究中低浓度的绿原酸对 UGT 活性有诱导作用,但相对高浓度绿原酸对 UGT 活性没有显著影响;绿原酸对美国白蛾 ABC 转运蛋白生物活性的影响是随着浓度的增加而呈现先升高后略微降低趋势(图 2)。ABC 转运蛋白主要在解毒过程第 3 阶段起作用,排出由 CYP450 和 GSTs 等解毒相关蛋白活化共轭连接的毒素复合物(Jin *et al*., 2018)。这些结果表明,绿原酸对美国白蛾幼虫体内不同解毒相关蛋白生物活性的影响存在差异,绿原酸的解毒代谢可能需要不同解毒相关蛋白的协调作用才能完成。

本研究针对绿原酸对美国白蛾死亡率、营养效应指标、生长发育的影响以及解毒相关蛋白活性的影响进行研究,发现绿原酸可影响美国白蛾幼虫利用食物营养的效率以及解毒相关蛋白的活性,同时也对美国白蛾幼虫的生长发育、行为、繁殖等生命活动以及子代种群数量产生不利影响,而美国白蛾幼虫可以通过调节食物的取食量和消化率以及诱导活化解毒相关蛋白的活性,增强对绿原酸的代谢能力,从而对寄主植物中一定含量的绿原酸产生适应。本研究将有助于揭示绿原酸的抗虫作用机制,以及美国白蛾对含绿原酸的寄主植物的选择和适应策略,对于制定和完善美国白蛾的防治策略具有重要的指导作用。

参考文献 (References)

Appel HM, 1993. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol*., 19(7): 1521-1552.

Awmack CS, Leather SR, 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol*., 47: 817-844.

Barbenhenn RV, Walker AC, Uddin F, 2003. Antioxidants in the midgut fluids of a tannin-tolerant and a tannin-sensitive caterpillar: effects of seasonal changes in tree leaves. *J. Chem. Ecol*., 29(5): 1099-1116.

Cao LJ, Yang F, Tang SY, Chen M, 2014. Development of an artificial diet for three lepidopteran insects. *Chin. J. Appl. Entomol*., 51(5): 1376-1386. [曹利军, 杨帆, 唐思莹, 陈敏, 2014. 适合三种鳞翅目昆虫的一种人工饲料配方. 应用昆虫学报, 51(5): 1376-1386]

Chen CY, Kang ZJ, Shi XY, Gao XW, 2015. Metabolic adaptation mechanisms of insects to plant secondary metabolites and their implications for insecticide resistance of insects. *Acta Entomol. Sin*., 58(10): 1126-1139. [陈澄宇, 康志娇, 史雪岩, 高希武, 2015. 昆虫对植物次生物质的代谢适应机制及其对昆虫抗药性的意义. 昆虫学报, 58(10): 1126-1139]

Chung H, Bogwitz MR, McCart C, Andrianopoulos A, Ffrench-Constant RH, Batterham P, Daborn PJ, 2006. *Cis*-regulatory elements in the *Accord* retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1*. *Genetics*, 175(3): 1071-1077.

Cui SF, Wang L, Ma L, Geng XQ, 2016. P450-mediated detoxification of botanicals in insects. *Phytoparasitica*, 44(5): 589-599.

Deng Y, 2018. Transcriptome Sequencing for Identification of Diapause-associated Genes and Genetic Differentiation of *Hyphantria cunea* (Drury). MSc Thesis, Shenyang Agricultural University, Shenyang. [邓煜, 2018. 美国白蛾滞育相关基因的筛选与种群分化的研究. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文]

Felton GW, Tumlinson JH, 2008. Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Curr. Opin. Plant Biol*., 11(4): 457-463.

Firidin B, Bilgener M, Yanar O, Altun N, İnce İA, 2008. The effect of nutritional quality of some plant's leaf on the feeding and development of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). *Int. J. Nat. Eng. Sci*., 2(3): 61-68.

Francis F, Vanhaelen N, Haubruge E, 2005. Glutathione S-transferases

in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 58(3): 166–174.

Gao JM, Zhang AL, Zhang KJ, Zhao XM, 1999. Review on distribution, extraction and bioactivity of chlorogenic acid. *J. Northwest For. Univ.*, 14(2): 73–82. [高锦明, 张鞍灵, 张康健, 赵晓明, 1999. 绿原酸分布、提取与生物活性研究综述. 西北林学院学报, 14(2): 73–82]

Gomi T, 2007. Seasonal adaptations of the fall webworm *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) following its invasion of Japan. *Ecol. Res.*, 22(6): 855–861.

Gong B, Zhang GF, 2014. Interactions between plants and herbivores: a review of plant defense. *Acta Ecol. Sin.*, 34(6): 325–336.

Hao JY, Zhang DY, Wan Y, Zhao WG, Yao XH, Li L, 2019. Comparison on main active components and their activity in mulberry leaf of 5 major varieties planted in Shaanxi Province. *Seric. Sci.*, 45(1): 100–107. [郝静怡, 张东阳, 万毅, 赵卫国, 姚晓慧, 李龙, 2019. 陕西省 5 个主栽桑树品种桑叶主要活性成分的含量及活性比较. 蚕业科学, 45(1): 100–107]

Hemingway J, 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(11): 1009–1015.

Hlavica P, 2011. Insect cytochromes P450: topology of structural elements predicted to govern catalytic versatility. *J. Inorg. Biochem.*, 105(10): 1354–1364.

Hu ZH, Yang D, Shen YB, 2009. Difference of phenolic contents in leaves of *Populus simonii* × *P. pyramidalis* Opera 8277 cuttings induced by various damages. *Acta Bot. Bor.-Occid. Sin.*, 29(2): 332–337. [胡增辉, 杨迪, 沈应柏, 2009. 不同损伤形式诱导合作杨叶片中酚类物质浓度的差异. 西北植物学报, 29(2): 332–337]

Huang JG, Yang WJ, Sang XQ, Zhao HH, 2014. Insecticidal activities of nine compounds extracted from *Cacalia tangutica*. *J. South China Agric. Univ.*, 35(1): 64–68. [黄继光, 杨文杰, 桑晓清, 赵欢欢, 2014. 从羽裂蟹甲草分离的 9 种化合物的杀虫活性. 华南农业大学学报, 35(1): 64–68]

Huang MY, Li XF, 2018. Effects of plant secondary metabolite on detoxification enzyme activity of *Spodoptera litura*. *Genomics Appl. Biol.*, 37(8): 3495–3502. [黄敏燕, 李雪峰, 2018. 植物次生物质对斜纹夜蛾解毒酶活性的影响. 基因组学与应用生物学, 37(8): 3495–3502]

Jin MH, Liao CY, Chakrabarty S, Zheng WG, Wu KM, Xiao YT, 2018. Transcriptional response of ATP-binding cassette (ABC) transporters to insecticides in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 154: 46–59.

Kundu A, Vadassery J, 2019. Chlorogenic acid-mediated chemical defense of plants against insect herbivores. *Plant Biol.*, 21(2): 185–189.

Li LS, Yuan YF, Wu L, Chen M, 2018. Effects of host plants on the feeding behavior and detoxification enzyme activities in *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 61(2): 232–239. [李路莎, 袁郁斐, 武磊, 陈敏, 2018. 不同寄主植物对美国白蛾幼虫取食行为及解毒酶活性的影响. 昆虫学报, 61(2): 232–239]

Liu HJ, 2016. Effects and Mechanism of Chlorogenic Acid on the Pathogenicity of *Lymantria dispar* Necleopolyhydrovirus. MSc Thesis, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot. [刘海晶, 2016. 绿原酸对舞毒蛾核型多角体病毒致病力的影响及其机理. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文]

Osier TL, Hwang SY, Lindroth RL, 2000. Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth *Lymantria dispar* performance in the field and laboratory. *Ecol. Entomol.*, 25(2): 197–207.

Qin JD, Wang CZ, 2001. On the relation of interaction of insects and plants to evolution. *Acta Entomol. Sin.*, 44(3): 360–365. [钦俊德, 王琛柱, 2001. 论昆虫与植物的相互作用和进化的关系. 昆虫学报, 44(3): 360–365]

Rani PU, Jyothsna Y, 2010. Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense. *Plantarum*, 32(4): 695–701.

Sullivan GT, Karaca I, Ozman-Sullivan SK, Yang ZQ, 2011. Chalcidoid parasitoids of overwintered pupae of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in hazelnut plantations of Turkey's central Black Sea region. *Can. Entomol.*, 143(4): 411–414.

Sullivan GT, Ozman-SullivanSK, 2012. Tachinid (Diptera) parasitoids of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in its native North America and in Europe and Asia – A literature review. *Entomol. Fenn.*, 23(4): 181–192.

Summers CB, Felton GW, 1994. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24(9): 943–953.

Sun L, Zhang LJ, Meng L, Wang RY, Chen J, Jia DZ, 2003. Determination of chlorogenic acid in mulberry leaves by RP-HPLC. *Chin. Trad. Herb. Drugs*, 34(1): 78–79. [孙莲, 张丽静, 孟磊, 王瑞英, 陈坚, 贾殿增, 2003. RP-HPLC 法测定桑叶中绿原酸的浓度. 中草药, 34(1): 78–79]

Waldbauer GP, 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.*, 5: 229–288.

Wang XL, Wang YT, Duan LQ, Li HP, Feng SJ, 2014. Effects of four plant phenolics on the growth and development and fecundity of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(7): 831–836. [王晓丽, 王予彤, 段立清, 李海平, 冯淑军, 2014. 四种植物酚类物质对舞毒蛾生长发育及繁殖的影响. 昆虫学报, 57(7): 831–836]

Winde I, Wittstock U, 2011. Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. *Phytochemistry*, 72(13): 1566–1575.

Xu ZH, Cui SR, He Y, Li D, Zhao M, Zhang X, 2004. Plant secondary metabolites and their effects on insect management. *Plant Prot.*, 30(4): 8–11. [徐正浩, 崔绍荣, 何勇, 李迪, 赵明, 张旭, 2004. 植物次生代谢物质和害虫防治. 植物保护, 30(4): 8–11]

Zhang KJ, Ma XH, Ma M, Wang L, Zhang T, 1999. A study on dynamic accumulation of metabolites during the growth of *Eucommia*

ulmoides Oliv. *Sci. Silv. Sin.*, 35(2): 15 - 20. [张康健, 马希汉, 马梅, 王蓝, 张檀, 1999. 杜仲叶次生代谢物生长积累动态的研究. 林业科学, 35(2): 15 - 20]

Zhang SM, Mo JC, Cheng ML, Xue ZH, Shen LF, Cheng JA, 2005. Effects of tannic acid on the development of larvae of the fenvalerate-resistant and susceptible strains of *Culex pipiens palllens* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 48(6): 886 - 891. [张时妙, 莫建初, 程梦林, 薛智慧, 沈利丰, 程家安, 2005. 单宁酸对淡色库蚊抗氰戊菊酯品系和敏感品系幼虫生长发育的影响. 昆虫学报, 48(6): 886 - 891]

Zhang YE, Ma HJ, Feng DD, Lai XF, Chen ZM, Xu MY, Yu QY, Zhang Z, 2012. Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. *J. Econ. Entomol.*, 105(3): 1034 - 1042.

Zhu CJ, Chen F, Yao MY, Zhou ZY, Zhou CZ, 2016. Content determination of chlorogenic acid contained in different parts of amur honeysuckle. *West. J. Trad. Chin. Med.*, 29(3): 35 - 37. [朱成姣, 陈飞, 姚梅悦, 周祉延, 周长征, 2016. 金银木不同部位绿原酸的含量测定. 西部中医药, 29(3): 35 - 37]

Zhu XZ, Luo JY, Zhang S, Lv LM, Wang CY, Cui JJ, 2018. Effects of plant secondary metablites gossypol and rutin on the activities of protective enzymes and detoxification enzymes in green mirid bug *Apolygus lucorum*. *J. Plant Prot.*, 45(5): 1044 - 1053. [朱香镇, 雒珺瑜, 张帅, 吕丽敏, 王春义, 崔金杰, 2018. 植物源次生物质棉酚和芸香苷对绿盲蝽保护酶与解毒酶活性的影响. 植物保护学报, 45(5): 1044 - 1053]

(责任编辑: 赵利辉)